

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09283

研究課題名(和文)ハプトグロビンは頭蓋内出血後の合併症及び予後の予測因子になりうるか

研究課題名(英文)Is haptoglobin one of possible predictive markers for complications or prognosis after intracranial hemorrhage?

研究代表者

神田 芳郎 (Koda, Yoshiro)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：90231307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血清蛋白ハプトグロビンの濃度に影響するcommon多型(HP1-1、HP2-1、HP2-2)、rs2000999型、欠失アリルとハプロタイプ、血中及び髄液中のハプトグロビン濃度の搬入時及び経時変化と、脳血管攣縮、遅発性脳虚血、脳梗塞などの合併症や死亡率、予後との関連解析をおこなったが、いずれにも有意な関連は認められなかった。

さらに、HP2の前駆体であるZonulin濃度と攣縮の発現や機能転帰、死亡率との関連を検証するため、市販のELISA(酵素結合免疫吸着検査法)キットを数種検討したが、本来検出されるはずのないHP1-1型血清にもZonulinが検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近報告されているハプトグロビン多型とくも膜下出血の予後や合併症との統計的に有意な関係は本研究では認められず、さらに他の遺伝子多型やそれらの組合せ(遺伝子)、また血液や髄液中のハプトグロビン濃度(蛋白濃度)やその変化とも関係がなかった。一方、ハプトグロビンのある型は中枢神経系に必要な物質を取り込み有害な物質の通過を遮断あるいは排出する機能に重要な脳関門バリアの開閉に関わっており、これが合併症や予後に影響する可能性を考え、濃度測定を行うため数種の測定システムを検定した結果、型を分別出来ていないことが分かり、報告されている多数の疾患との関係の信憑性を問う結果となった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the association between the genetic polymorphisms those are associated with serum haptoglobin level, haptoglobin common polymorphism (HP1-1, HP2-1, HP2-2), rs2000999, deletion allele, their haplotypes, serum or cerebrospinal fluid haptoglobin at admission or time-dependent change and cerebrovascular spasm, delayed cerebral ischemia, complications such as cerebral infarction, mortality, prognosis. We did not any association between them. In addition, to validate the relation of the concentration of zonulin, precursor of HP2, to the spasm, functional outcome or mortality, we evaluated the specificity of several commercial ELISA kits. However, all of them reacted with serum of not only HP2-2, HP2-1 but HP1-1 phenotype.

研究分野：法医学

キーワード：ハプトグロビン 頭蓋内出血 関連解析 ゾヌリン 遺伝子多型

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳血管障害は我が国の死因の上位に位置づけられる疾患で、法医解剖事例には外傷性の頭蓋内出血もしばしば認められる。最近、様々なヒト集団で、脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血の予後に深く関与する脳血管攣縮、その後に発現する遅発性脳虚血、脳梗塞といった合併症、あるいは死亡率が、ハプトグロビンの common 多型、HP1-1、HP2-1、HP2-2 と関係があることが示された。HP2-2 群は他の型に比べて有意に遅発性脳攣縮発現を起こしやすく、機能転帰が悪く、さらに死亡率も高いという結果が示されている(引用文献)。くも膜下腔の遊離型ヘモグロビンが脳血管攣縮の発症に関与し、ハプトグロビンはヘモグロビンに結合しその酸化障害作用を中和するものと理解されていることから、この差異は、HP2-2 のヘモグロビン結合能が HP1-1 及び HP2-1 に比べ低いことに起因し、それが遊離ヘモグロビンのクリアランスの違いとして現れ、結合能の弱い HP2-2 型のグループでは他より脳血管攣縮の発現が多い結果になると推定されているが、他の理由、例えば、ハプトグロビン濃度、HP² の遺伝子産物である HP2 の前駆体である Zonulin が関与する血液脳関門 (blood-brain barrier, BBB) の透過性の変化による何らかの物質の輸送なのかについては調べられていない。

(2) 脳虚血病態において脳浮腫や二次損傷は発症後数時間から数日を経て進行するため、治療介入の時間的余裕があり BBB 障害は急性期治療の有効な標的となりうるが、治療法を開発する上で BBB 機能のマーカーは重要である。当初小腸上皮のタイトジャンクション (TJ) 構成分子として同定された Zonulin は細菌感染や小麦蛋白グリアジン等に暴露されると放出され、TJ の緩みを引き起こし、結果的に上皮細胞間の選択的な物質通過の制御が破綻する。BBB には、中枢神経系にとって有害な血液中の物質の通過を遮断し、中枢神経系に必要な物質を血液中から取り込み、不要な物質を血液中に排出する機能を有する。この BBB にも Zonulin 及びその受容体が発現していることが分かっている。

血管内で遊離ヘモグロビンはハプトグロビンと結合し、この複合体は CD163 を介しマクロファージに取り込まれ処理されるが、頭蓋内出血に伴う髄液中の遊離 Hb の無毒化パスウェイや、遅発性脳虚血における BBB 傷害への HP2 の前駆体である Zonulin の関与についてはほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

(1) 複数の研究グループや集団を対象としたデータから、ハプトグロビンの common 多型と、脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血後の合併症や予後には関連がある可能性が高い。この結果を手掛かりに脳外科領域の救急搬送症例(頭蓋内出血例)を対象とし、ハプトグロビンの common 多型のみならずハプトグロビンとその近傍の遺伝子多型それぞれと、それらからなるハプロタイプの、頭蓋内出血後の合併症を含む予後や致死率の予測因子としての有用性の有無を明らかにする。

(2) 末梢血と髄液中のハプトグロビンをはじめとする各種関連蛋白の経時的な変化を調べ、ハプトグロビンの common 多型と、合併症を含む予後や致死率に認められている関係が、多型間のどのような違い、単純にヘモグロビンに結合できるハプトグロビン濃度が重要なのか、髄液中の、HP2 の前駆体である Zonulin が関与をしているのか、に起因するのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 臨床サンプルの採取と診断: 救急搬送された脳血管障害あるいは頭部外傷による頭蓋内出血をきたした患者を対象とし、治療とさまざまな基準に準じた臨床的な判定をおこなった。検体は可能な限り、搬送時、4日後、14日後に採取した。

(2) 遺伝子と蛋白の解析: 患者末梢血から分離した血漿及び髄液中のハプトグロビン濃度は、株式会社エスアールエルへの検査委託、市販あるいは自作の ELISA システムを用いて決定した。Zonulin は市販の数種類の ELISA キットの有用性を検討し、さらに自作の ELISA システム作製のため数種の抗体の特異性を確認した。ハプトグロビン common 多型(蛋白多型)はポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定した。白血球からゲノム DNA を抽出し、遺伝子多型、common 多型、ハプトグロビン遺伝子完全欠失アリル HP^{del} の接合性、rs2000999 について TaqMan probe 法に基づくリアルタイム PCR 法により決定した。

(3) データ解析: 多型から形成されるハプロタイプは、フリーソフトウェア Phasev2.1.1 を用いて推定した。得られた結果から出血後の血中ハプトグロビン濃度と遺伝子多型、あるいはハプロタイプとの関係を調べた。さらに、単変量解析あるいは交絡因子を考慮した多変量解析により、ハプトグロビンの遺伝子多型、ハプロタイプ、血中濃度が頭蓋内出血後の合併症を含む予後、死亡率の予測因子となり得るかどうかを調べた。

4. 研究成果

(1) ハプトグロビンとハプトグロビン関連遺伝子内に存在する多型、ハプロタイプと予後: くも膜下出血をきたした患者群について、出血後の合併症や予後の予測因子を探索する目的で、

ハプトグロビン common 多型、ハプトグロビン欠失アリルである Hp^{del}、ハプトグロビン関連遺伝子に局在する SNP である rs2000999 の遺伝子型、さらにこれらから形成されるハプロタイプと、脳血管攣縮、遅発性脳虚血、脳梗塞などの合併症や死亡率、各種基準に準じておこなった臨床的な判定に基づいた予後との関係について関連解析をおこなった。なお、本研究で調べた遺伝子多型はいずれもハプトグロビン濃度に影響することが知られている多型である(引用文献)。その結果、サンプル数が少ないこと、さらに日本人では HP¹ の頻度が低いことも影響するものと考えられるが、ハプトグロビン common 多型と、合併症や予後、死亡率との間に関連は認められなかった。さらに、rs2000999 についても、この多型が HP 濃度と関係があると考えた additive model (加法モデル) で考慮するとこれらとの関係は認められなかった。また、ハプトグロビン common 多型、HP^{del}、rs2000999 により形成されるハプロタイプにも同様に関連を認めなかった。

(2)ハプトグロビン濃度と予後：搬入時、4日後、14日後の血中 HP 濃度の経時的变化を解析した結果、予後良好群では、搬入時予後不良群より高濃度で4日後まで増加し14日後では減少する傾向が認められた。しかしながら予後不良群では、搬入時のハプトグロビン濃度は良好群よりも低濃度であり良好群と同様に4日後では搬入時より増加し、14日後ではさらに増加しており、経時的な変化に差異が認められた。このような傾向は、髄液では観察されなかった。しかしながら、症例数が増加すると、認められていた差異が消失した。臨床的な有用性を考え、搬入時のハプトグロビン濃度のみでも予測マーカーとして有効であるかを調べたが、濃度と合併症、死亡率、予後との間に有意な関係は認められなかった。

(3) HP2の前駆体 Zonulin の測定：HP2の前駆体である Zonulin とその受容体が、BBB にも発現していることが分かっているが、遅発性脳虚血における BBB 傷害への Zonulin の関与についてはほとんど理解されていない。そこで、Zonulin と攣縮の発現や機能転帰、死亡率との関連を検証するため、Zonulin の発現が本当に HP2-2 型と HP2-1 型に限られ、HP1 型では発現していないのか、さらに、くも膜下出血をきたした患者群の予後と、髄液中の Zonulin 濃度との間に関連があるのかを調べるための予備実験として、市販の ELISA キットを用い、血清中の Zonulin 濃度を定量した。その結果、HP1-1 型の血清中にも Zonulin が存在することが示唆された。別の市販の ELISA システムが Zonulin を認識していないという報告も存在することから、市販されている ELISA キットを数種比較したが、いずれも HP1-1 型に Zonulin が検出された。またこの結果から、今回使用していないものの汎用される市販キットが Zonulin 以外の蛋白を認識するという複数の報告が発表されている(引用文献)。このことは、関連解析にあたっては、ハプトグロビンの common 多型との関係を調べる必要があることを意味し、これらのキットを用いて得られている、Zonulin 濃度と、自己免疫疾患、癌、炎症疾患、肥満症の重症度等との関連の信憑性が疑われる。Zonulin 抗体数種を購入しその特異性を調べたが、いずれも HP1-1 型の血清にも反応を示すことから、現在までに定量検査に有用な抗体を得ておらず、今後は抗体の作製を含め定量システムを構築し、頭蓋内出血に伴う髄液中の遊離ヘモグロビンの無毒化パスウェイや、遅発性脳虚血における BBB 傷害への Zonulin の関与と、ハプトグロビンの common 多型間に認められている脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血の予後に関与する脳血管攣縮、その後発現する遅発性脳虚血、脳梗塞といった合併症、あるいは死亡率の差異との関係を明らかにしたいと考えている。

< 引用文献 >

Leclerc JL et al., Haptoglobin Phenotype Predicts the Development of Focal and Global Cerebral Vasospasm and May Influence Outcomes After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. Proc Natl Acad Sci U S A, Vol 112, No. 4, 2015, pp. 1155-1160.

Soejima M et al., Genetic Factors Associated With Serum Haptoglobin Level in a Japanese Population. Clin Chim Acta, Vol. 433, 2014, pp. 54-57.

Scheffler L et al., Widely Used Commercial ELISA Does Not Detect Precursor of Haptoglobin2, but Recognizes Properdin as a Potential Second Member of the Zonulin Family. Front Endocrinol (Lausanne), 2018, 9:22.

Ajamian M et al., Serum Zonulin as a Marker of Intestinal Mucosal Barrier Function: May Not Be What It Seems. PLoS One, Vol. 14, No. 1, 2019, e0210728.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Soejima M, Munkhtulga L, Furukawa K, Iwamoto S, Koda Y.	4. 巻 505
2. 論文標題 Serum haptoglobin correlates positively with cholesterol and triglyceride concentrations in an obese Mongolian population.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Chim Acta	6. 最初と最後の頁 176-182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cca.2020.03.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Soejima M, Koda Y.	4. 巻 59
2. 論文標題 Genetic variation of FUT2 in a Peruvian population: identification of a novel LTR-mediated deletion and characterization of 4 nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transfusion.	6. 最初と最後の頁 2415-2421
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/trf.15298.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kazmi N, Koda Y, Ndiaye NC, Visvikis-Siest S, Morton MJ, Gaunt TR, Galea I.	4. 巻 494
2. 論文標題 Genetic determinants of circulating haptoglobin concentration.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Chim Acta.	6. 最初と最後の頁 138-142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cca.2019.03.1617.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Soejima M, Teye K, Koda Y.	4. 巻 483
2. 論文標題 The haptoglobin promoter polymorphism rs5471 is the most definitive genetic determinant of serum haptoglobin level in a Ghanaian population.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Chim Acta.	6. 最初と最後の頁 303-307
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cca.2018.05.029.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 神田 芳郎
2. 発表標題 ハプトグロビン遺伝子欠失について
3. 学会等名 第102次日本法医学会学術全国集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mikiko Soejima, Yoshiro Koda
2. 発表標題 Genetic variation of FUT2 in a Peruvian population.
3. 学会等名 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine (IALM) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koda Y, Soejima M
2. 発表標題 DNA polymorphisms associated with serum haptoglobin concentration in a Japanese population.
3. 学会等名 10 th International Symposium Advances in Legal Medicine (ISALM2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 池谷博、神田芳郎、清水恵子、宮古淳一	4. 発行年 2017年
2. 出版社 TECOM	5. 総ページ数 127
3. 書名 臨床事例で学ぶ医療倫理・法医学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

久留米大学医学部法医学講座ホームページ
<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/foren/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	副島 美貴子 (Soejima Mikiko) (80279140)	久留米大学・医学部・准教授 (37104)	
研究分担者	青木 孝親 (Aoki Takachika) (70330842)	久留米大学・医学部・講師 (37104)	